

CFM03526
18/810,550,5
CN

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 2 日
Date of Application:

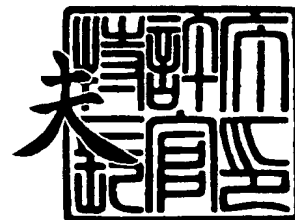
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 9 4 5 7
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 9 9 4 5 7]

出 願 人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 4 月 1 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 2 8 4 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 251767

【提出日】 平成15年 4月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 感染症検出用プローブおよびプローブセットならびに担体、遺伝子検査方法

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 石井 美絵

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 川口 正浩

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 塚田 護

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 吉井 裕人

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

 【氏名】 鈴木 智博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 山本 伸子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 小倉 真哉

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100076428

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 康德

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100112508

【弁理士】

【氏名又は名称】 高柳 司郎

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100115071

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 康弘

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100116894

【弁理士】

【氏名又は名称】 木村 秀二

【電話番号】 03-5276-3241

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003458

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0102485

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 感染症検出用プローブおよびプローブセットならびに担体、遺伝子検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 大腸菌由来の遺伝子を検出する感染症検出用プローブであって、

5' 末端から 3' 末端方向への塩基配列が、

配列 1 ; 5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3'

を有するオリゴヌクレオチド及びその相補鎖配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする感染症検出用プローブ。

【請求項 2】 大腸菌由来の遺伝子を検出する感染症検出用プローブであって、

5' 末端から 3' 末端方向への塩基配列が、

配列 2 ; 5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'

を有するオリゴヌクレオチド及びその相補鎖配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする感染症検出用プローブ。

【請求項 3】 大腸菌由来の遺伝子を検出する感染症検出用プローブであって、

5' 末端から 3' 末端方向への塩基配列が、

配列 3 ; 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3'

を有するオリゴヌクレオチド及びその相補鎖配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする感染症検出用プローブ。

【請求項 4】 大腸菌由来の遺伝子を検出する感染症検出用プローブであって、

5' 末端から 3' 末端方向への塩基配列が、

配列 4 ; 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'

を有するオリゴヌクレオチド及びその相補鎖配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする感染症検出用プローブ。

【請求項 5】 大腸菌由来の遺伝子を検出する感染症検出用プローブであって、

て、

5' 末端から3' 末端方向への塩基配列が、

配列 5 ; 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'

を有するオリゴヌクレオチド及びその相補鎖配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする感染症検出用プローブ。

【請求項 6】 大腸菌由来の遺伝子を検出する感染症検出用プローブであって、

5' 末端から3' 末端方向への塩基配列が、

配列 6 ; 5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3'

を有するオリゴヌクレオチド及びその相補鎖配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする感染症検出用プローブ。

【請求項 7】 大腸菌由来の遺伝子を検出する感染症検出用プローブであって、

5' 末端から3' 末端方向への塩基配列が、

配列 7 ; 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'

を有するオリゴヌクレオチド及びその相補鎖配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする感染症検出用プローブ。

【請求項 8】 大腸菌由来の遺伝子を検出するプローブセットであって、

5' 末端から3' 末端方向への塩基配列が以下の配列及びその相補鎖配列のうちのいずれか 1 つを有するオリゴヌクレオチドから成る 1 4 種類の感染症検出用プローブのうち 1 種類以上の感染症検出用プローブを備えることを特徴とするプローブセット。

配列 1 ; 5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3'

配列 2 ; 5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'

配列 3 ; 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3'

配列 4 ; 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'

配列 5 ; 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'

配列 6 ; 5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3'

配列 7 ; 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'

【請求項 9】 請求項 8 に記載の感染症検出用プローブのうち、少なくとも 1 種類の感染症検出用プローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の担体を用いて大腸菌由来の遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、感染症疾患の原因菌の検出および同定に有用な感染症起因菌由来のプローブおよびプローブセットならびに担体、遺伝子検査方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、DNAチップ（またはDNAマイクロアレイともいう。以下同じ）を用いた遺伝子発現解析が創薬を初め種々の領域で行なわれている。それは、各種遺伝子セット（プローブ）が配置されたDNAマイクロアレイに、それぞれ異なった検体DNAを反応させ、各検体に存在するそれぞれの遺伝子量を比較して、各ステージで大量に存在する（発現量の高い）遺伝子、或いは逆に不活性化している（発現量の低い）遺伝子を分類し、機能と関連付けて解析するものである。

【0003】

感染症の起炎菌検査はその一例であり、江崎らは特許文献1において、DNAプローブとして染色体DNAが固定化されたDNAチップを用いる微生物同定法を提案している。この方法によれば、互いにGC含量の異なる複数の既知微生物由来の染色体DNAと、検体中の未知微生物由来の染色体DNAとを反応させ、生じたハイブリダイゼーション複合体を検出することで検体中の未知微生物を検出することが可能である。

【0004】

また、大野らは感染症の起炎菌検査のためのDNAチップに用いるプローブとして、特許文献2で制限酵素断片を利用した真菌の検出用プローブを、特許文献

3で緑膿菌の検出用プローブを、特許文献4でEscherichia coli（エシェリキア コリ）菌、klebsiella pneumoniae（クレブシエラ ニューモニエ）菌ならびにEnterobacter cloacae（エンテロバクター クロアカエ）菌の制限酵素断片を利用した検出用プローブをそれぞれ提案している。

【0 0 0 5】

【特許文献1】

特開 2 0 0 1 - 2 9 9 3 9 6 号公報

【特許文献2】

特開平 6 - 1 3 3 7 9 8 号公報

【特許文献3】

特開平 1 0 - 3 0 4 8 9 6 号公報

【特許文献4】

特開平 1 0 - 3 0 4 8 9 7 号公報

【0 0 0 6】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記従来技術に示したDNAチップは、染色体DNA或いは制限酵素断片等のDNAプローブを利用するものであり、いずれも微生物から直接取り出したDNAを材料としている。このため、一度に大量に調製することは困難であり、臨床診断用には適さないという問題があった。これは臨床診断用に用いるためには、安価で均質なDNAチップの大量生産が必要であり、このためにプローブ溶液として均質なDNAの大量調製が不可欠となってくるところ、DNAプローブでは、このような大量調製ができないからである。なお、DNAプローブであっても、PCR増幅反応を利用することで当該DNAを徐々に増加させていくことは可能であるが、PCR反応では、一度に大量調製することは困難であることから、臨床診断用に利用することは難しい。

【0 0 0 7】

また、DNAプローブは塩基長が長いため、類似菌種間における菌種の同定が困難であり、例えば感染症検出用には適さないという問題があった。これは、感染症の治療においては菌種の特定とそれに応じた抗生剤の選択・投与が必要であ

り、このために感染症検出用プローブには、同種内の詳細な区別までは必要としないまでも（つまり同種内は一括検出でき）、類似する他の種の細菌は区別して検出できるような機能が求められるからである。一方、例えば特許文献4で示されているエシェリキア コリ菌、クレブシエラ ニューモニエ菌、エンテロバクター クロアカエ菌の制限酵素断片を用いたDNAチップでは、プローブの塩基長が長いために、これら3菌種相互間に交差反応が生じてしまい、類似する個々の菌を区別することができず、感染症検出用に利用することは難しい。

【0008】

本発明は、上記に鑑みてなされたものであり、一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供することを目的とする。

【0009】

より具体的には、感染症の原因菌である大腸菌の検出に適した感染症検出用プローブを提供することを目的とするものである。

【0010】

また、これらの類似菌種間の差異がDNAチップ上で精度良く評価可能であるよう、感染症検出用プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することを目的とする。

【0011】

また、これらの感染症検出用プローブと検体との反応を行なう為に、これらの感染症検出用プローブが固定された担体を提供することを目的とする。

【0012】

さらに、検体溶液との反応の過程で、これらの感染症検出用プローブが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成するために本発明に係るプローブセットは、以下のような構成を備える。即ち、

大腸菌由来の遺伝子を検出するプローブセットであって、

5' 末端から3' 末端方向への塩基配列が以下の配列及びその相補鎖配列のうちのいずれか1つを有するオリゴヌクレオチドから成る14種類の感染症検出用プローブのうち1種類以上の感染症検出用プローブを備えることを特徴とするプローブセット。

配列 1 ; 5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3'

配列 2 ; 5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'

配列 3 ; 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3'

配列 4 ; 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'

配列 5 ; 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'

配列 6 ; 5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3'

配列 7 ; 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'

【発明の実施の形態】

はじめに本発明の概要について説明する。上述した課題に対応すべく、本発明にかかる感染症検出用プローブは、大腸菌の検出に適した配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴としている。つまり、オリゴヌクレオチドであれば化学的に大量合成が可能であり、精製や濃度のコントロールが可能であるため、一度での大量調製を実現できる。またオリゴヌクレオチドプローブは、前述したDNAプローブよりも比較的塩基長が短いため、類似菌種間における交差反応を回避し、菌種の同定を容易に実現することができる。

【0014】

さらに、本発明にかかる感染症検出用プローブが固定された担体は、オリゴヌクレオチドをBJプリンタを用いて吐出し、化学的に結合させることで作製することを特徴としている。これにより、従来法に比べ、プローブがはがれにくくなるうえ、感度が向上するという付帯的な効果も得られる。つまり、従来から一般的に用いられるスタンフォード法と呼ばれるスタンピング法によりDNAチップを生成した場合（例えば、宝酒造は、がん疾患に関連するヒト由来既知遺伝子のcDNA断片をスポット或いはスタンプにより塗布することでDNAチップを生成している）、塗布したDNAがはがれやすいという欠点があった。また、従来

のように、DNAチップ上で合成によりプローブを配置した場合（例えば、AffymetrixのDNAチップ等）は、各プローブ配列ごとの合成収量が異なるために、正確な評価ができないという欠点があった。本発明にかかる担体は、かかる点についても考慮して作製されており、従来に比べ安定に固定されはがれにくく、高感度かつ高精度の検出ができる点を特徴としている。以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0015】

大腸菌用のプローブ設計は、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分より、当該菌に対し非常に特異性が高く、十分かつそれぞれのプローブ塩基配列でばらつきのないハイブリダイゼーション感度が期待できるように行なった。これらのオリゴヌクレオチドプローブは、担体上に結合された二種以上のプローブと検体とのハイブリダイゼーション反応において、安定なハイブリッド体を形成し、良好な結果を与えるように設計されている。

【0016】

本実施形態のDNAチップが検査の対象とする検体としては、ヒト、家畜等の動物由来の血液、喀痰、胃液、腭分泌物、口腔内粘液等の体液、尿及び糞便のような排出物等細菌が存在すると思われるあらゆる物を対象とする。また、食中毒、汚染の対象となる食品、飲料水及び温泉水のような環境中の水等、細菌による汚染が引き起こされる可能性のある媒体全てが挙げられる。さらに、輸出入時における検疫等の動植物も検体としてその対象とする。

【0017】

また、本実施形態のDNAチップが対象とする検体としては、抽出した核酸そのものでも良いが、16s rRNA検出用に設計されたPCR反应用プライマーを用いて調製された増幅検体、或いはPCR増幅物を元にさらにPCR反応等を行なって調製された検体、PCR以外の増幅方法により調製された検体、可視化のために各種標識法により標識された検体等、いずれの調製法により調製された検体をも含む。

【0018】

また、本実施形態のDNAチップに用いられる担体は、ガラス基板、プラスチ

ック基板、シリコンウェハー等の平面基板、凹凸のある三次元構造体、ビーズのような球状のもの、棒状、紐状、糸状のもの等あらゆるものを含む。さらに、その基板の表面をプローブDNAの固定化が可能のように処理したものも含む。特に、表面に化学反応が可能となるように官能基を導入したものは、ハイブリダイゼーション反応の過程でプローブが安定に結合している為に、再現性の点で好ましい形態である。

【0019】

本発明に用いられる固定化方法としては、例えば、マレイミド基とチオール（-SH）基との組合わせを用いる例が挙げられる。即ち核酸プローブの末端にチオール（-SH）基を結合させておき、固相表面がマレイミド基を有するように処理しておくことで、固相表面に供給された核酸プローブのチオール基と固相表面のマレイミド基とが反応して核酸プローブを固定化する。

【0020】

マレイミド基の導入方法としては、まず、ガラス基板にアミノシランカップリング剤を反応させ、次にそのアミノ基とEMCS試薬（N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide : Dojin社製）との反応によりマレイミド基を導入する。

DNAへのSH基の導入は、DNA自動合成機でDNAを合成する際に5'-Thiol-ModifierC6（Glen Research社製）を用いる事により行なうことができる。

【0021】

固定化に利用する官能基の組合わせとしては、上記したチオール基とマレイミド基の組合わせ以外にも、例えばエポキシ基（固相上）とアミノ基（核酸プローブ末端）の組合わせ等が挙げられる。また、各種シランカップリング剤による表面処理も有効であり、該シランカップリング剤により導入された官能基と反応可能な官能基を導入したオリゴヌクレオチドが用いられる。さらに、官能基を有する樹脂をコーティングする方法も利用可能である。

【0022】

以下実施例によりさらに詳細に説明する。

【0023】

【実施例1】 1 Step PCR法を用いた微生物の検出

[1. プローブDNAの準備]

大腸菌株検出用プローブとして表1に示す核酸配列を設計した。具体的には、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分より、以下に示したプローブ塩基配列を選んだ。これらのプローブ塩基配列群は、当該菌に対し非常に特異性が高く、十分かつそれぞれのプローブ塩基配列でばらつきのないハイブリダイゼーション感度が期待できるように設計されている（なお、表1に示す各プローブ塩基配列はこれに完全に一致したものに限定される必要はなく、該各プローブ塩基配列を含む20から30程度の塩基長を有するプローブ塩基配列も表1に示す各プローブ塩基配列に含まれるものとする。また、これらのプローブ塩基配列の相補的な配列（配列番号14～20）もまた、同じ機能を有するためにプローブ塩基配列として有効である。）。

【0024】

【表1】

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
大腸菌	P-1	1	5' CTC TTGCCATCGGATGTGCCCA 3'
	P-2	2	5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'
	P-3	3	5' TTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3'
	P-4	4	5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'
	P-5	5	5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'
	P-6	6	5' CGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGT 3'
	P-7	7	5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'

【0025】

表中に示したプローブは、DNAマイクロアレイに固定するための官能基として、合成後、定法に従って核酸の5'末端にチオール基を導入した。官能基の導入後、精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥したプローブは、-30℃の冷凍庫に保存した。

【0026】

[2. 検体増幅用PCRプライマーの準備]

大腸菌株の16s rRNA遺伝子（標的遺伝子）増幅用PCRプライマーとして表2に示す核酸配列を設計した。

【0027】

具体的には、大腸菌株の16s rRNAをコーディングしているゲノム部分を特異的に増幅するプローブセット、つまり約1400～1700塩基長の16s rRNAコーディング領域の両端部分で、特異的な融解温度をできるだけ揃えたプライマーを設計した。なお、変異株や、ゲノム上に複数存在する16s rRNAコーディング領域も同時に増幅できるように複数種類のプライマーを設計した。

【0028】

【表2】

	Primer No.	配列番号	配列
Forward Primer	F-1	8	5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3'
	F-2	9	5' GCGGCAGGCCTAACACATGCAAG 3'
	F-3	10	5' GCGGCAGGCTTAACACATGCAAG 3'
Reverse Primer	R-1	11	5' ATCCAGCCGCACCTTCCGATAC 3'
	R-2	12	5' ATCCAACCGCAGGTTCCCCTAC 3'
	R-3	13	5' ATCCAGCCGCAGGTTCCCCTAC 3'

【0029】

表中に示したプライマーは、合成後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製し、Forward Primer 3種、Reverse Primer 3種を混合し、それぞれのプライマー濃度が、最終濃度10pmol/ μ lとなるようにTE緩衝液に溶解した。

【0030】

[3. 大腸菌Genome DNA（モデル検体）の抽出]

[3-1] 微生物の培養 & Genome DNA抽出の前処理

まず、大腸菌標準株（ATCC11775）を、定法に従って培養した。

【0031】

この微生物培養液を1.5ml容量のマイクロチューブに1.0ml（OD₆₀₀=0.7）採取し、遠心分離で菌体を回収した（8500rpm、5min、4℃）。上清を捨てた後、Enzyme Buffer（50mM Tris-HCl:p.H. 8.0、25mM EDTA）300 μ lを加え、ミキサーを用いて再懸濁した。再懸濁した菌液は、再度、遠心分離で菌体を回収した（8500rpm、5min、4℃）。上清を捨てた後、回収された菌体に、以下の酵素溶液を加え、ミキサーを用いて再懸濁した。

【 0 0 3 2 】

Lysozyme 50 μ l (20 mg/ml in Enzyme Buffer)
N-Acetylmuramidase SG 50 μ l (0.2 mg/ml in Enzyme Buffer)。

【 0 0 3 3 】

次に、酵素溶液を加え再懸濁した菌液を、37℃のインキュベーター内で30min 静置し、細胞壁の溶解処理を行った。

【 0 0 3 4 】

[3-2] Genome抽出

以下に示す微生物のGenome DNA抽出は、核酸精製キット (MagExtractor-Genome- : TOYOBO社製) を用いて行った。

【 0 0 3 5 】

具体的には、まず、前処理した微生物懸濁液に溶解・吸着液750 μ lと磁性ビーズ40 μ lを加え、チューブミキサーを用いて、10min激しく攪拌した (ステップ1)。

【 0 0 3 6 】

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30sec静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた (ステップ2)。

次に、洗浄液900 μ lを加え、ミキサーで5sec程度攪拌して再懸濁を行った (ステップ3)。

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた (ステップ4)。

【 0 0 3 7 】

上記ステップ3、4を繰り返して2度目の洗浄を行なう (ステップ5)。その後、70%エタノール900 μ lを加え、ミキサーで5sec程度攪拌して再懸濁した (ステップ6)。

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30sec静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のま

ま、上精を捨てた（ステップ7）。

【0038】

上記ステップ6、7を繰り返して70%エタノールによる2度目の洗浄を行なう（ステップ8）。ステップ8の洗浄の後、回収された磁性粒子に純水100 μ lを加え、チューブミキサーで10min攪拌を行った（ステップ9）。

【0039】

次に分離用スタンド（Magical Trapper）にマイクロチューブをセットし、30sec静置して磁性粒子をチューブ壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を新しいチューブに回収した。

【0040】

[3-3] 回収したGenome DNAの検査

回収された微生物（大腸菌株）のGenome DNAは、定法に従って、アガロース電気泳動と260/280nmの吸光度測定を行い、その品質（低分子核酸の混入量、分解の程度）と回収量を検定した。本実施例では、約12 μ gのGenome DNAが回収され、Genome DNAのデグラデーションやrRNAの混入は認められなかった。回収したGenome DNAは最終濃度50ng/ μ lとなるようにTE緩衝液に溶解し、以下の実施例に使用した。

【0041】

[4. DNAマイクロアレイの作製]

[4-1] ガラス基板の洗浄

合成石英のガラス基板（サイズ：25mm x 75mm x 1mm、飯山特殊ガラス社製）を耐熱、耐アルカリのラックに入れ、所定の濃度に調製した超音波洗浄用の洗浄液に浸した。一晚洗浄液中で浸した後、20分間超音波洗浄を行った。続いて基板を取り出し、軽く純水ですすいだ後、超純水中で20min超音波洗浄をおこなった。次に80℃に加熱した1N水酸化ナトリウム水溶液中に10min基板を浸した。再び純水洗浄と超純水洗浄を行い、DNAマイクロアレイ用の石英ガラス基板を用意した。

【0042】

[4-2] 表面処理

シランカップリング剤KBM-603(信越シリコン社製)を、1%の濃度となるように純水中に溶解させ、2hr室温で攪拌した。続いて、先に洗浄したガラス基板をシランカップリング剤水溶液に浸し、20min室温で放置した。ガラス基板を引き上げ、軽く純水で表面を洗浄した後、窒素ガスを基板の両面に吹き付けて乾燥させた。次に乾燥した基板を120℃に加熱したオーブン中で1hrベークし、カップリング剤処理を完結させ、基板表面にアミノ基を導入した。次いで同仁化学研究所社製のN-マレイミドカプロイロキシスクシイミド(N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido) (以下EMCSと略す) を、ジメチルスルホキシドとエタノールの1:1混合溶媒中に最終濃度が0.3mg/mlとなるように溶解したEMCS溶液を用意した。

【0043】

ベークの終了したガラス基板を放冷し、調製したEMCS溶液中に室温で2hr浸した。この処理により、シランカップリング剤によって表面に導入されたアミノ基とEMCSのスクシイミド基が反応し、ガラス基板表面にマレイミド基が導入された。EMCS溶液から引き上げたガラス基板を、先述のEMCSを溶解した混合溶媒を用いて洗浄し、さらにエタノールにより洗浄した後、窒素ガス雰囲気下で乾燥させた。

【0044】

[4-3] プローブDNA

実施例1で作製した微生物検出用プローブを純水に溶解し、それぞれ、最終濃度(インク溶解時)10 μ Mとなるように分注した後、凍結乾燥を行い、水分を除いた。

【0045】

[4-4] BJプリンターによるDNA吐出、および基板への結合

グリセリン7.5wt%、チオジグリコール7.5wt%、尿素7.5wt%、アセチレノールEH(川研ファインケミカル社製)1.0wt%を含む水溶液を用意した。続いて、先に用意した7種類のプローブ(表1)を上記の混合溶媒に規定濃度なるように溶解した。得られたDNA溶液をバブルジェット(登録商標)プリンター(商品名:BJF-850 キヤノン社製)用インクタンクに充填し、印字ヘッドに装着した。

【0046】

なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンターは平板への印刷が可能のように改造を施したものである。またこのバブルジェット（登録商標）プリンターは、所定のファイル作成方法に従って印字パターンを入力することにより、約5ピコリットルのDNA溶液を約120 μ mピッチでスポッティングすることが可能となっている。

【0047】

続いて、この改造バブルジェット（登録商標）プリンターを用いて、1枚のガラス基板に対して、印字操作を行い、DNAマイクロアレイを作製した。印字が確実に行われていることを確認した後、30min加湿チャンバー内に静置し、ガラス基板表面のマレイミド基と核酸プローブ末端のチオール基とを反応させた。

【0048】

[4-5] 洗浄

30minの反応後、100mMのNaClを含む10mMのリン酸緩衝液(pH7.0)により表面に残ったDNA溶液を洗い流し、ガラス基板表面に一本鎖DNAが固定したDNAマイクロアレイを得た。

【0049】

[5. 検体の増幅と標識化（PCR増幅&蛍光標識の取り込み）]

検体となる微生物遺伝子の増幅、および、標識化反応を以下に示す。

【0050】

Premix PCR 試薬 (TAKARA ExTaq)	25 μ l	
Template Genome DNA	2 μ l	(10ng)
Forward Primer mix	2 μ l	(20pmol/tube each)
Reverse Primer mix	2 μ l	(20pmol/tube each)
Cy-3 dUTP (1mM)	2 μ l	(2nmol/tube)
H ₂ O	17 μ l	
Total	50 μ l	

【0051】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

【 0 0 5 2 】

95°C	10 min.	
92°C	45 sec.	← 35 Cycles └─┘
55°C	45 sec.	
72°C	45 sec.	
72°C	10 min.	

【 0 0 5 3 】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いて精製した後、増幅産物の定量を行い、標識化検体とした。

【 0 0 5 4 】

[6 . ハイブリダイゼーション]

上記「 4 . DNA マイクロアレイの作製」で作製した DNA マイクロアレイと「 5 . 検体の増幅と標識化 (P R C 増幅 & 蛍光標識の取り込み) 」で作製した標識化検体を用いて検出反応を行った。

【 0 0 5 5 】

[6 - 1] DNA マイクロアレイのブロッキング

B S A (牛血清アルブミン Fraction V : Sigma 社製) を 1wt% となるように 100mM NaCl / 10mM Phosphate Buffer に溶解し、この溶液に「 4 . DNA マイクロアレイの作製」で作製した DNA マイクロアレイを室温で 2hr 浸し、ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、0.1wt% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を含む 2 x SSC 溶液 (NaCl 300mM、Sodium Citrate (trisodium citrate dihydrate, $C_6H_5Na_3 \cdot 2H_2O$) 30mM、p.H. 7.0) で洗浄を行った後、純水でリンスしてからスピンドライ装置で水切りを行った。

【 0 0 5 6 】

[6 - 2] ハイブリダイゼーション

水切りした DNA マイクロアレイをハイブリダイゼーション装置 (Genomic Solutions Inc. Hybridization Station) にセットし、以下に示すハイブリダイゼーション溶液、条件でハイブリダイゼーション反応を行った。

【 0 0 5 7 】

[6-3] ハイブリダイゼーション溶液

6xSSPE / 10% Form amide / Target (2nd PCR Products 全量)

(6xSSPE: NaCl 900mM、NaH₂PO₄·H₂O 60mM、EDTA 6mM、p.H. 7.4)。

【 0 0 5 8 】

[6-4] ハイブリダイゼーション条件

65℃ 3min → 92℃ 2min → 45℃ 3hr → Wash 2 x SSC / 0.1% SDS
at 25℃ → Wash 2xSSC at 20℃ → (Rinse with H₂O : Manual) →
Spin dry (65℃で3分、92度で2分、45℃で3時間ハイブリダイゼーション反応させた後、2 x SSC / 0.1% SDS、25℃で洗浄、2xSSC、20℃で洗浄後、純水でリンスしスピンドライした。)

[7. 微生物の検出 (蛍光測定)]

ハイブリダイゼーション反応終了後のDNAマイクロアレイをDNAマイクロアレイ用蛍光検出装置 (Axon社製、GenePix 4000B) を用いて蛍光測定を行った。測定結果を表3に示す。

【 0 0 5 9 】

なお、本実施例は、2回実施し、それぞれの結果を表3に示した。

【 0 0 6 0 】

【表 3】

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
P-1	5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCCA 3' (配列番号 1)	1200	17.6	1200	17.9
P-2	5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3' (配列番号 2)	1500	22.1	1600	23.9
P-3	5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3' (配列番号 3)	1100	16.2	1200	17.9
P-4	5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3' (配列番号 4)	2000	29.4	2100	31.3
P-5	5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3' (配列番号 5)	1500	22.1	1500	22.4
P-6	5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3' (配列番号 6)	2400	35.3	2600	38.8
P-7	5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3' (配列番号 7)	1200	17.6	1200	17.9

【0061】

表 3 の蛍光輝度の数値（フォトマル電圧400V）は、ピクセル平均輝度（解像度 $5\mu\text{m}$ ）を示した。また、S/N比は、測定機付属の解析ソフト（Axon社製、GenePix Pro Ver.3.0）で測定したバックグラウンド平均値で蛍光輝度を除したものを示した。

【0062】

表 3 で明らかなように、再現性良く、十分なシグナルで大腸菌を検出することができる。

【0063】

【実施例 2】 2 Step PCR法を用いた微生物の検出

実施例 1 同様に、プローブDNA、検体増幅用PCRプライマー、大腸菌Genome DNA、DNAマイクロアレイを用意し、以下の実験を行った。

【0064】

[1. 検体の増幅と標識化（PCR増幅&蛍光標識の取り込み）]

検体となる微生物遺伝子の増幅（1st PCR）、および、標識化（2nd PCR）反応

を以下に示す。

【0065】

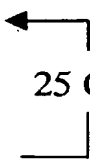
[2. 増幅反応液組成: 1st PCR]

【0066】

Premix PCR 試薬 (TAKARA ExTaq)	25 μ l	
Template Genome DNA	2 μ l	(10ng: 実施例 3)
Forward Primer mix	2 μ l	(20pmol/tube each)
Reverse Primer mix	2 μ l	(20pmol/tube each)
H ₂ O	19 μ l	
Total		50 μ l

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

【0067】

95°C	10 min.	
92°C	45 sec.	 25 Cycles
55°C	45 sec.	
72°C	45 sec.	
72°C	10 min.	

【0068】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いて精製した後、増幅産物の定量を行った。

【0069】

[3. 標識化反応液組成: 2nd PCR]

【0070】

Enzyme (QIAGEN Hotstar Taq Polymerase)	0.5 μ l	(2.5u)
Template DNA (1st PCR Product)	10 μ l	(30ng)
dNTP mix (Low dTTP)*	2 μ l	
Cy-3 dUTP (1mM)	2 μ l	(2nmol/tube)
Reverse Primer mix	5 μ l	(50pmol/tube each)
10 x Buffer	5 μ l	
H ₂ O	25.5 μ l	
Total	50 μ l	

* dNTP mix (Low dTTP): dATP, dCTP, dGTP / 5mM (final : 10 nmol/tube)
dTTP / 4mM (final : 8 nmol/tube)

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

【0071】

95°C	10 min.	
92°C	45 sec.	←
55°C	45 sec.	25 Cycles
72°C	45 sec.	—
72°C	10 min.	

【0072】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いて精製し、標識化検体とした。

【0073】

[4. ハイブリダイゼーション]

実施例1と同様に行った。

【0074】

[5. 微生物の検出 (蛍光測定)]

ハイブリダイゼーション反応終了後のDNAマイクロアレイをDNAマイクロアレイ用蛍光検出装置 (Axon社製、GenePix 4000B) を用いて蛍光測定を行った

。測定結果を表 4 に示す。

【0075】

なお、本実施例は、2 回実施し、それぞれの結果を表 4 に示した。

【0076】

【表 4】

Probe No.	配列	1 回目		2 回目	
		蛍光輝度	S/N 比	蛍光輝度	S/N 比
P-1	5' CTCCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3' (配列番号 1)	5600	76.7	6200	83.8
P-2	5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3' (配列番号 2)	7600	104.1	7500	101.4
P-3	5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3' (配列番号 3)	5600	76.7	5700	77
P-4	5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3' (配列番号 4)	9400	128.8	9300	125.7
P-5	5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3' (配列番号 5)	7200	98.6	7200	97.3
P-6	5' CGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGT 3' (配列番号 6)	11500	157.5	11500	155.4
P-7	5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3' (配列番号 7)	5600	76.7	5500	74.3

【0077】

表 4 の蛍光輝度の数値 (フォトマル電圧400V) は、ピクセル平均輝度 (解像度 $5\mu\text{m}$) を示した。また、S/N 比は、測定機付属の解析ソフト (Axon社製、Gene Pix Pro Ver.3.0) で測定したバックグラウンド平均値で蛍光輝度を除したものを示した。

【0078】

表 4 で明らかなように、再現性良く、十分なシグナルで大腸菌を検出することができる。

【0079】

以上述べたように、本実施形態及びその実施例によれば、大腸菌由来の遺伝子を検出するにあたり、微生物由来の DNA プローブの従来の問題を解決することが可能となる。すなわち、オリゴヌクレオチドプローブは化学的に大量合成が可

能であり、精製や濃度のコントロールが可能である。また、細菌の種による分類を目的に、同じ種の菌種は一括検出が可能で、しかも、他の種の細菌は区別して検出できるようなプローブセットを提供することができる。

【0080】

また、これらの差異がDNAマイクロアレイ上で精度良く評価できるよう、プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することができる。さらにはこれらのプローブDNAと検体との反応を行なう為に、これらのプローブDNAが固定された担体を提供することができる。このプローブ及びプローブセットと検体溶液とを反応せしめる過程で、これらのプローブDNAが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体を提供することができる。

【0081】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供することが可能となる。

【0082】

より具体的には、感染症の原因菌である大腸菌の検出に適した感染症検出用プローブを提供することが可能となる。

【0083】

また、これらの類似菌種間の差異がDNAチップ上で精度良く評価可能であるよう、感染症検出用プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することが可能となる。

【0084】

また、これらの感染症検出用プローブと検体との反応を行なう為に、これらの感染症検出用プローブが固定された担体を提供することが可能となる。

【0085】

さらに、検体溶液との反応の過程で、これらの感染症検出用プローブが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担

体を提供することが可能となる。

【配列表】

<110> キヤノン株式会社 CANON, INC.

<120> 感染症検出用プローブおよびプローブセットならびに担体、遺伝子検査
方法

<160> 20

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

ctcttgccat cggatgtgcc ca

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

atacctttgc tcattgacgt tacccg

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

tttgctcatt gacgttaccc gcag

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

actggcaagc ttgagtctcg taga

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

atacaaagag aagcgacctc gcg

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

cggacctcat aaagtgcgtc gtagt

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

gcgggggagga agggagtaaa gttaat

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

gcggcgtgcc taatacatgc aag

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

gcggcaggcc taacacatgc aag

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

gcggcaggct taacacatgc aag

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

atccagccgc accttccgat ac

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

atccaaccgc aggttcccct ac

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

atccagccgc aggttcccct ac

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

tgggcacatc cgatggcaag ag

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

cgggtaacgt caatgagcaa aggtat

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

ctgcgggtaa cgtcaatgag caaa

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

tctacgagac tcaagcttgc cagt

<210> 18

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

cgcgaggctg cttctctttg tat

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

actacgacgc actttatgag gtccg

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

attaacttta ctcccttcct ccccg

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供することを目的とする。

【解決手段】 大腸菌由来の遺伝子を検出する感染症検出用プローブであって、5'末端から3'末端方向への塩基配列が、配列1；5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3'を有するオリゴヌクレオチド及びその相補鎖配列を有するオリゴヌクレオチドから成ることを特徴とする。



特願 2 0 0 3 - 0 9 9 4 5 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 0 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号

氏 名

キャノン株式会社